

1

明 細 書

生体低分子誘導体

5

技術分野

本発明は、2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、又はこれらの誘導体によって修飾した生体低分子誘導体と該誘導体により合成された高分子架橋体に関する。

10

背景技術

これまで、生体接着剤や生体由来の医療用デバイスの処理（例えば、ブタ由来心臓弁）には、人工的に化学合成されたグルタルアルデヒドなどのアルデヒドを有する架橋剤や1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどの縮合剤等が用いられていた（例えば、特許文献1～6、非特許文献1）。

15

特許文献1 特開平7-163650号公報

特許文献2 特開平9-249751号公報

特許文献3 特開平10-71199号公報

20

特許文献4 特表2000-502380号公報

特許文献5 特開平8-53548号公報

特許文献6 特表平8-502082号公報

- 1 非特許文献1 Biomaterials, 17巻, 765頁, (1996)

発明の開示

5 これまで医療用デバイスの処理等に用いられている架橋剤や縮合剤は、主に人工的に合成された非天然のものであり、生体内で代謝されず生体に対して毒性を示すことが指摘されている。そのため、医療現場で用いる際には用途や使用量が制限されている。このような問題点を解決するため、生体由来の架橋剤の開発が求められている。

10 本発明は、2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、又はこれらの誘導体によって修飾した生体低分子誘導体とこの誘導体を用いることにより得られた高分子架橋体を提供する。

すなわち、本発明は、2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、
15 又はこれらの誘導体によって少なくとも1つ以上修飾した生体低分子誘導体である。かかる生体低分子誘導体は、人体に対し無害であり、反応基（-COOH基）を2個以上有するために迅速な反応が可能である。

また、本発明は、2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、又は
20 はこれらの誘導体によって少なくとも1つ以上修飾した生体低分子誘導体を用いて高分子を架橋することにより得られた高分子架橋体である。

かかる高分子架橋体は生体内に適用後は生体内で代謝され、一定期間経過する

- 1 と吸収、消失する特性があり、体内に異物として残存することがない。

図面の簡単な説明

第1図は、クエン酸誘導体の核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

5

発明を実施するための最良の形態

本発明で使用する2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子は、クエン酸回路に存在するトリ又はジカルボン酸低分子、例えば、リンゴ酸、オキサリ酢酸、クエン酸、cis-アコニット酸、2-ケトグルタル酸、又はこれらの誘導体である。

10

本発明における生体低分子誘導体は、2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子のカルボキシル基にカルボジイミドの併用下に細胞毒性の低いN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、又はこれらの誘導体を反応させ、活性エステルを導入したものである。

15

かかる反応物は、生体低分子0.001~10重量%に対し、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、又はこれらの誘導体を0.001~10重量%、カルボジイミド(EDC)を0.001~20重量%の割合で用い、反応温度0~100℃、反応時間1~48時間の適宜の条件を選択して得られる。

20

なお、カルボジイミドとしては、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩(EDC)、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド・メト-p-トルエンスルホン酸塩、ジシクロヘキ

1 シルカルボジイミドを用いることができる。なお、反応溶媒には、N、N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いることができる。

第1図は、クエン酸とN-ヒドロキシスクシンイミドをEDC存在下の反応により得られたクエン酸誘導体の核磁気共鳴スペクトルのチャートである。aのピークは、クエン酸のメチレンプロトンを示し、bのピークはスクシンイミジル基のメチレンプロトンに由来するものである。残りの2つのピークは、溶媒 (DMSO) である。

架橋体を調製する際に用いるタンパク質は、コラーゲン (数10種類のタイプ
10 によらない)、アテロコラーゲン (数10種類のタイプによらない)、アルカリ可溶化コラーゲン (数10種類のタイプによらない)、ゼラチン、ケラチン、血清アルブミン、卵白アルブミン、ヘモグロビン、カゼインおよびグロブリン、フィブリノーゲン等アミノ基を有する高分子が含まれる。これらのタンパク質は、由来する生物によらない。

15 架橋体を調製する際に用いるグリコサミノグリカンには、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、又はこれらの誘導体が含まれる。これらのグリコサミノグリカンは、分子量、由来する生物によらない。

また、その他の高分子としてキトサン (脱アセチル化度、分子量によらない)、
20 ポリアミノ酸 (アミノ酸の種類、分子量によらない)、ポリアルコール (種類、分子量によらない) が含まれる。

生体低分子誘導体と高分子との架橋反応は、高分子0.1～50重量%に対し、

- 1 生体低分子誘導体 0.01～50 重量%、好ましくは、30～50℃で反応させる。なお、両者の配合に際しては、均一な架橋体を得やすいことから双方を適宜の濃度の溶液として混合するのが好ましい。なお、かかる溶液を作成するための
- 5 溶媒としては、蒸留水のほか、生理食塩水、炭酸水素ナトリウム、ホウ酸、リン酸等の緩衝液、有機溶媒（DMF、DMSO、エタノール）等、毒性のないものを用いることができる。

（実施例）

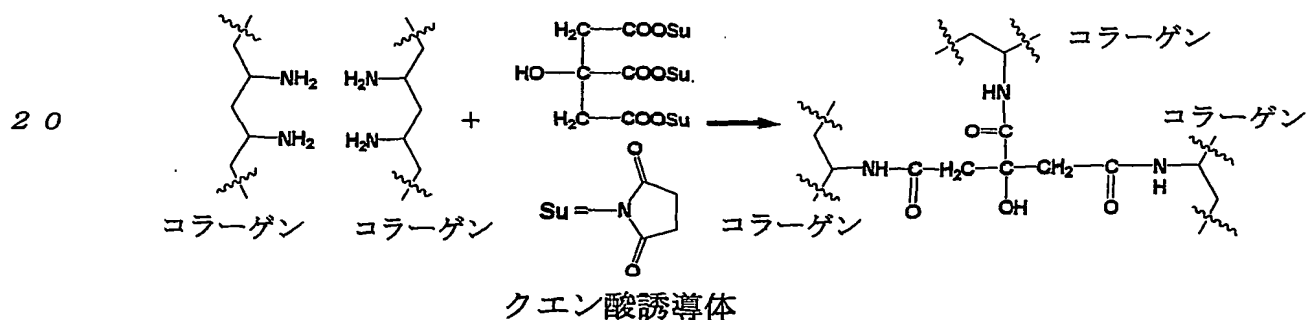
実施例 1-1

- クエン酸の DMF 溶液（5 重量%）中に室温にて、N-ヒドロキシスクシンイミドを 3.2 当量分と EDC を 3.1 当量分加え、24 時間攪拌した。続いて、反応溶液中の有機溶媒である DMF のみを減圧留去した。得られた残渣をアセトン-*n*-ヘキサンの展開溶媒を用いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、クエン酸の 3 つのカルボキシル基が、N-ヒドロキシスクシンイミドに修飾された誘導体を合成した。

15 実施例 1-2

以下、実施例 1-1 で合成したクエン酸誘導体を用いて下記の反応により得られるコラーゲンゲルの合成について説明する。

（化 1）



- 1 合成したクエン酸誘導体 24 μ L をジメチルスルホキシド溶液 976 μ L で溶
解させ、その溶液中より 100 μ L 計り取り、1.25 重量%のII型コラーゲン
りん酸緩衝溶液 400 μ L 中に加え、攪拌した。室温にて24時間静置し、架橋
5 剤濃度 0.4 ~ 40 mM のコラーゲングルを合成した。それぞれのゲルの重量を
測定した後、凍結乾燥機にて乾燥後、再度ゲルの重量を測定し、ゲルの含水率を
調べた。それぞれのゲルの含水率は、表1に示す。

(表1)

	クエン酸誘導体濃度 (mM)	含水率 (%)
	0.4	98
10	1	98
	2	96
	4	97
	8	97
	10	97
	20	98
	30	98
	40	98

15

実施例 2-1

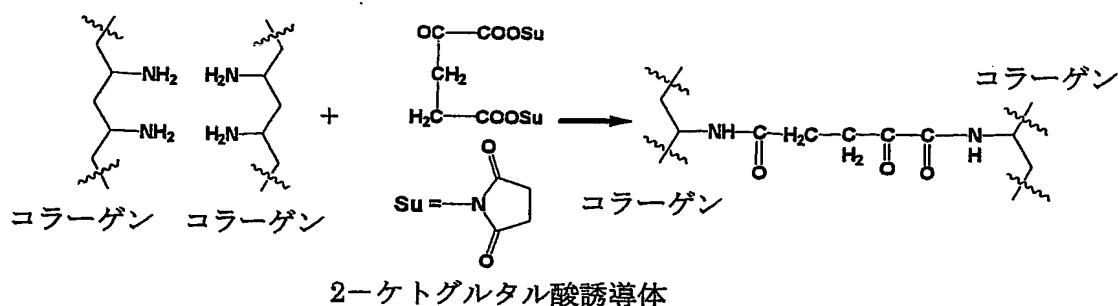
- 2-ケトグルタル酸のDMF溶液(5重量%)中に室温にて、N-ヒドロキシス
クシンイミドを2.2当量分とEDCを2.1当量分加え、24時間攪拌した。
続いて、反応溶液中の有機溶媒であるDMFのみを減圧留去した。得られた残渣
20 をアセトン-n-ヘキサンの展開溶媒を用いて、シリカゲルカラムクロマトグラ
フィーにて精製し、2-ケトグルタル酸の2つのカルボキシル基が、N-ヒドロ
キシスクシンイミドに修飾された誘導体を合成した。

1 実施例 2-2

以下、実施例 2-1 で合成した 2-ケトグルタル酸誘導体を用いて下記の反応により得られるコラーゲンゲルの合成について説明する。

(化 2)

5



10

合成した 2-ケトグルタル酸誘導体 14 μ L をジメチルスルホキシド溶液 986 μ L で溶解させ、その溶液中より 100 μ L 計り取り、1.25 重量%の II 型コラーゲンりん酸緩衝溶液 400 μ L 中に加え、攪拌した。室温にて 24 時間静置し、架橋剤濃度 0.6 ~ 1.0 mM のコラーゲンゲルを合成した。それぞれのゲルの重量を測定した後、凍結乾燥機にて乾燥後、再度ゲルの重量を測定し、ゲルの含水率を調べた。それぞれのゲルの含水率は、表 2 に示す。

15

(表 2)

2-ケトグルタル酸誘導体濃度 (mM)	含水率 (%)
0.6	98
0.8	98
1	98
4	97
8	98
10	97

20

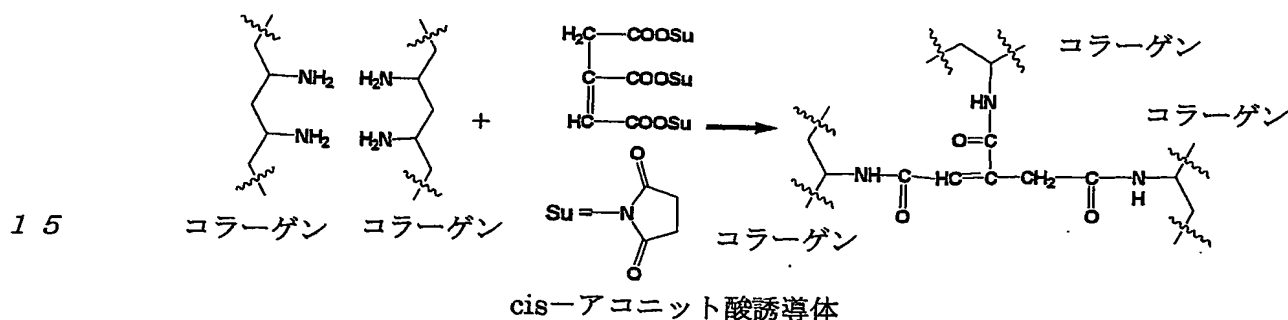
1 实施例 3-1

cis-アコニット酸のDMF溶液(5重量%)中に室温にて、N-ヒドロキシスクシンイミドを3.2当量分とEDCを3.1当量分加え、24時間攪拌した。続いて、反応溶液中の有機溶媒であるDMFのみを減圧留去した。得られた残渣をアセトン-n-ヘキサンの展開溶媒を用いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、cis-アコニット酸の3つのカルボキシル基が、N-ヒドロキシスクシンイミドに修飾された誘導体を合成した。

实施例 3-2

以下、実施例 3-1 で合成した cis-アコニット酸誘導体を用いて下記の反応に
10 より得られるコラーゲンゲルの合成について説明する。

(化 3)



合成したcis-アコニット酸誘導体 46 μL をジメチルスルホキシド溶液 954 μL で溶解させ、その溶液中より 100 μL 計り取り、1.25 重量%のII型コラーゲンりん酸緩衝溶液 400 μL 中に加え、攪拌した。室温で24時間静置し、架橋剤濃度1~30 mMのコラーゲンを合成した。それぞれのゲルの重量を測定した後、凍結乾燥機にて乾燥後、再度ゲルの重量を測定し、ゲルの含水率を

1 調べた。それぞれのゲルの含水率は、表 3 に示す。

(表 3)

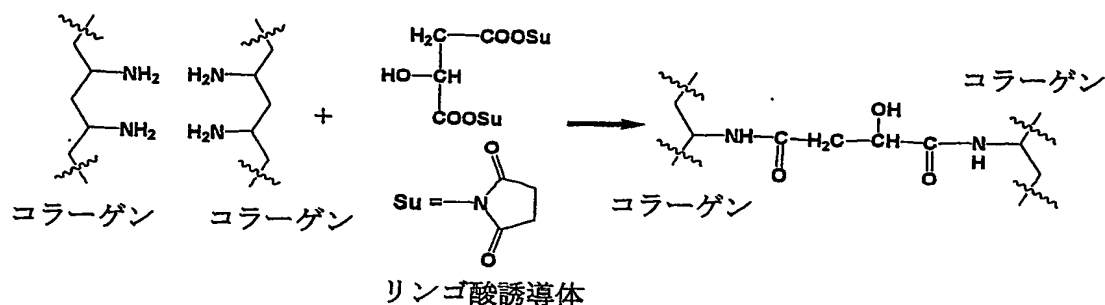
	cis-アコニット酸誘導体濃度 (mM)	含水率 (%)
5	1	97
	2	97
	4	97
	8	97
	10	97
	30	97

10 実施例 4-1

リンゴ酸の DMF 溶液 (5 重量%) 中に室温にて、N-ヒドロキシスクシンイミドを 2.2 当量分と EDC を 2.1 当量分加え、24 時間攪拌した。続いて、反応溶液中の有機溶媒である DMF のみを減圧留去した。得られた残渣をアセトン-
n-ヘキサンの展開溶媒を用いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて
15 精製し、リンゴ酸の 2 つのカルボキシル基が、N-ヒドロキシスクシンイミドに修飾された誘導体を合成した。

以下、実施例 4-1 で合成したリンゴ酸誘導体を用いて下記の反応により得られるコラーゲンゲルの合成について説明する。

(化 4)



合成したリンゴ酸誘導体 32 μ L をジメチルスルホキシド溶液 968 μ L で溶解させ、その溶液中より 100 μ L 計り取り、1.25 重量%のII型コラーゲンりん酸緩衝溶液 400 μ L 中に加え、攪拌した。室温で24時間静置すると架橋剤濃度 3～50 mM のコラーゲンゲルを合成した。それぞれのゲルの重量を測定した後、凍結乾燥機にて乾燥後、再度ゲルの重量を測定し、ゲルの含水率を調べた。それぞれのゲルの含水率は、表 4 に示す。

(表 4)

リンゴ酸誘導体濃度 (mM)	含水率 (%)
3	97
4	98
5	97
6	97
8	97
10	97
20	97
40	97
50	97

実施例 5 - 1

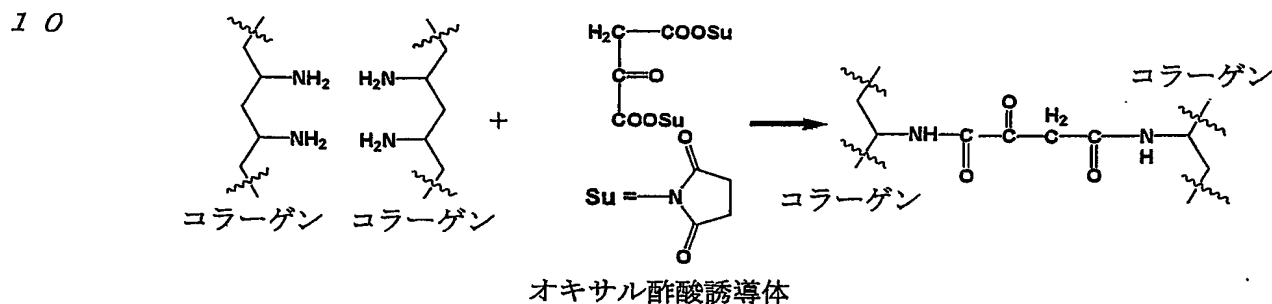
オキサリ酢酸の DMF 溶液 (5 重量%) 中に室温にて、N-ヒドロキシスクシン

- 1 イミドを 2. 2 当量分と EDC を 2. 1 当量分加え、24 時間攪拌した。続いて、
反応溶液中の有機溶媒である DMF のみを減圧留去した。得られた残渣をアセト
ン-n-ヘキサンを展開溶媒を用いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに
て精製し、オキサリ酢酸の 2 つのカルボキシル基が、N-ヒドロキシスクシンイ
ミドに修飾された誘導体を合成した。

実施例 5-2

以下、実施例 5-1 で合成したオキサリ酢酸誘導体を用いて下記の反応により
得られるコラーゲンゲルの合成について説明する。

(化 5)



15

- 合成したオキサリ酢酸誘導体 16 μL をジメチルスルホキシド溶液 984 μL
で溶解させ、その溶液中より 100 μL 計り取り、1.25 重量%の II 型コラー
ゲンりん酸緩衝溶液 400 μL 中に加え、攪拌した。室温で 24 時間静置し、架
橋剤濃度 2~40 mM のコラーゲンゲルを合成した。それぞれのゲルの重量を測
定した後、凍結乾燥機にて乾燥後、再度ゲルの重量を測定し、ゲルの含水率を調
べた。それぞれのゲルの含水率は、表 5 に示す。

20

(表 5)

オキサル酢酸誘導体 (mM)	含水率 (%)
2	98
4	97
6	98
8	97
10	98
20	96
40	98

10 産業上の利用可能性

以上のようにゲル化する生体高分子は、架橋反応を直接患部で行い、生体用接着剤、止血剤、血管塞栓材、動脈瘤の封止剤のいずれかに適用させる。また、一旦架橋反応させた後に用いることにより、癒着防止剤、組織再生用足場材料、薬物担体として好適に用いられる。

15

20

1

請 求 の 範 囲

5

1. 2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシルホスクシンイミド、又はこれらの誘導体によって少なくとも1つ以上修飾したことを特徴とする生体低分子誘導体。

2. 2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子がクエン酸回路に存在する低分子およびその誘導体であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の生体低分子誘導体。

10

3. 2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子が、リンゴ酸、オキサロ酢酸、クエン酸、cis-アコニット酸、2-ケトグルタル酸、又はこれらの誘導体であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の生体低分子誘導体。

4. 請求の範囲第1項記載の生体低分子誘導体を用いて高分子を架橋することにより得られたことを特徴とする高分子架橋体。

15

5. 高分子がタンパク質、グリコサミノグリカン、キトサン、ポリアミノ酸、ポリアルコール、又はこれらの2つ又はそれ以上の組み合わせであることを特徴とする請求の範囲第4項記載の高分子架橋体。

6. 高分子がコンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、又はこれらの誘導体からなるグリコサミノグリカンであることを特徴とする請求の範囲第4項記載の高分子架橋体。

20

7. 高分子がコラーゲン、アテロコラーゲン、アルカリ可溶化コラーゲン、ゼラチン、ケラチン、血清アルブミン、卵白アルブミン、ヘモグロビン、カゼインおよびグロブリン、フィブリノーゲン、又はこれらの誘導体からなるタンパク質で

1 あることを特徴とする請求の範囲第4項記載の高分子架橋体。

5

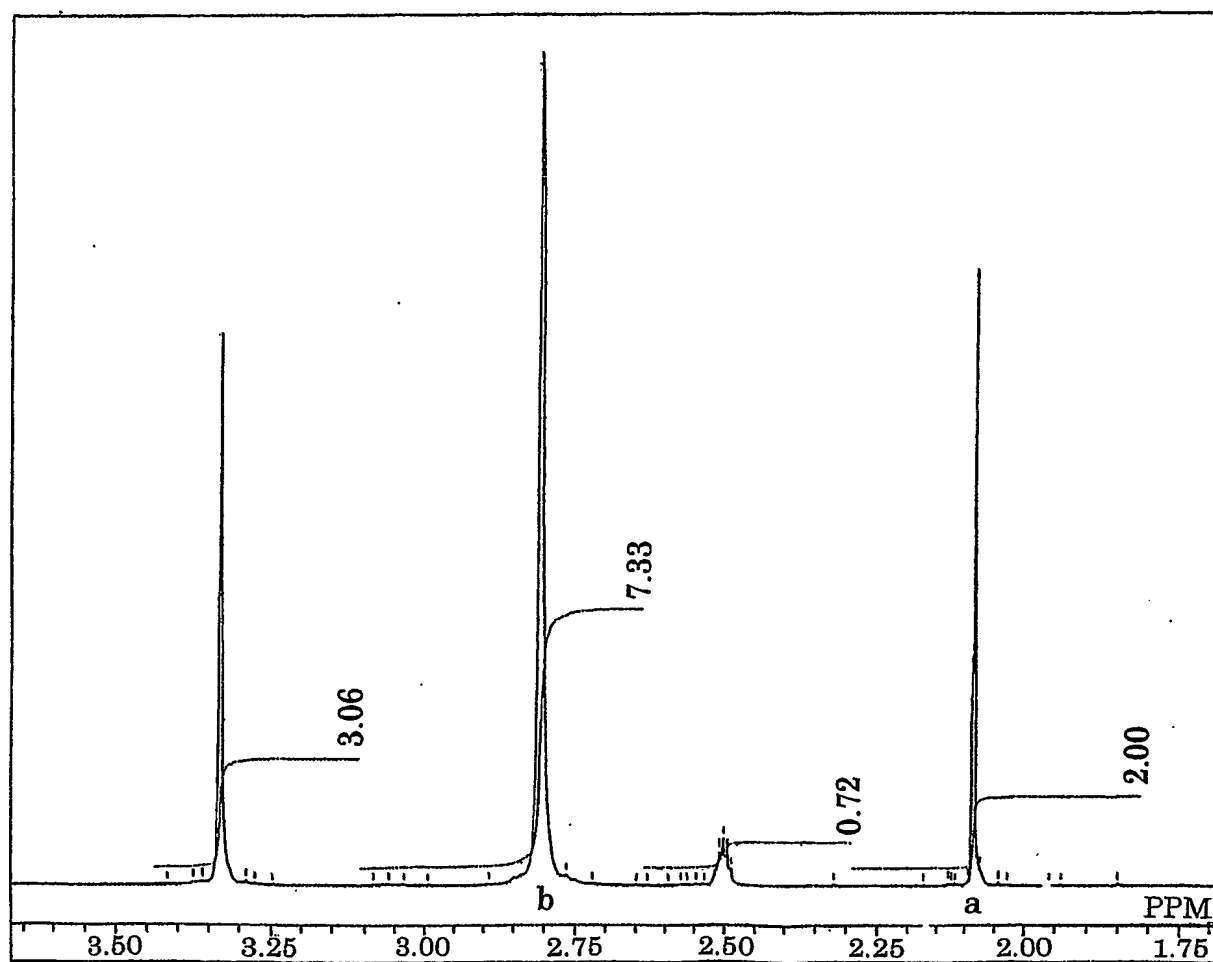
10

15

20

1/1

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07D207/46, C08J3/24 // A61L27/18, 26/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07D207/46, C08J3/24 // A61L27/18, 26/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 61-69759 A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 10 April, 1986 (10.04.86), Full text (Family: none)	1-7
X	WO 01/91814 A (VIRIDIS BIOTECH INC.), 12 June, 2001 (12.06.01), Full text & EP 1284992 A	1-7
X	SAKAMOTO, Takeshi; Li, Hao; KIKUGAWA, Yasuo, A Total Synthesis of Nannochelin A. A Short Route to Optically Active N. omega.-Hydroxy-.alpha.- amino Acid Derivatives, Journal of Organic Chemistry (1996), 61(24), 8496-8499	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 October, 2003 (15.10.03)Date of mailing of the international search report
28 October, 2003 (28.10.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

<Subject of search>

Even though the statement in the description is discussed, it is unclear what compounds are involved (other than those specifically cited) and what are not in the scope of the terms "low-molecular weight compounds having 2 or more carboxyl groups", "derivatives thereof", "biological low-molecular weight compounds", "derivatives thereof" and "high-molecular weight compounds" as set forth in claims. Moreover, various compounds over extremely broad scopes may fall within the categories thereof and thus complete search can be hardly made on each of these compounds. On the other hand, only part of the compounds as claimed in claims 1 to 7 are supported by the description in the meaning within Patent Cooperation Treaty Article 6 and disclosed in the description in the meaning within Patent Cooperation Treaty Article 5.

Therefore, claims 1 to 7 and the description do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

In this international search report, therefore, prior art documents were examined on the compounds specifically cited in the description in so far as possible and reasonable, concerning the inventions according to claims 1 to 7.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D207/46, C08J3/24 // A61L27/18, 26/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D207/46, C08J3/24 // A61L27/18, 26/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 61-69759 A (工業技術院長) 1986. 04. 10, 文献全体 (ファミリーなし)	1-7
X	WO 01/91814 A (VIRIDIS BIOTECH INC.) 2001. 06. 12, 文献全体 & EP 1284992 A	1-7
X	Sakamoto, Takeshi; Li, Hao; Kikugawa, Yasuo, A Total Synthesis of Nannochelin A. A Short Route to Optically Active N. omega. -Hydroxy-. alpha. -amino Acid Derivatives, Journal of Organic Chemistry (1996), 61(24), 8496-8499	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 10. 03

国際調査報告の発送日

28.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4P

8615

電話番号

03-3581-1101 内線 3492

<調査の対象について>

請求の範囲に記載された「2個以上のカルボキシル基を持つ生体低分子」、「これらの誘導体」、「生体低分子誘導体」、「その誘導体」及び「高分子」なる文言は、明細書の記載を検討しても、そこに具体的に記載されたもの以外に、いかなる化合物を包含し、また、包含しないか明確であるとはいえないし、また、極めて広範囲かつ多彩な化合物を包含し得るものであるので、そのすべてについて、完全な調査を行うことは困難である。一方、特許協力条約第6条の意味において明細書に裏付けられ、また、特許協力条約第5条の意味において明細書に開示されているものは、請求の範囲1-7の発明の化合物の中のごく僅かな部分に過ぎない。

したがって、請求の範囲1-7及び明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

そこで、この国際調査報告では、請求の範囲1-7の発明については、明細書に具体的に記載された化合物に基づいて、合理的な負担の範囲内で、先行技術文献調査を行った。